

Study of Stability, Zeta-potential, and Steady Rheological Properties of Nanoliposomes Containing Vitamin D₃

Maryam Mohammadi^{1,2}, Babak Ghanbarzadeh², Reza Rezaei Mokarram²,
Mohammad Yar Hoseini³, Hamed Hamishehkar^{4*}

¹Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran

³Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, University of Ilam, Iran

⁴Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 12 Oct, 2013

Accepted: 15 Dec, 2013

Abstract

Background and Objectives: Vitamin D is a group of sterol compounds and a liposoluble vitamin that has major role in the matrix of cartilage and bones. Food fortification with liposoluble vitamin is not straightforward, because of this vitamins is poorly dispersible in aqueous systems such as beverages. The encapsulation of nutraceutical compounds in lipid-based carrier systems, like nanoliposomes, is effective in the preservation of their native properties during storage. The objective of the present study was to prepare vitamin D₃ nanoliposomes, characterization, and stability studies of prepared formulation.

Materials & Methods: In this experimental study, the nanoliposomes containing vitamin D₃ were prepared from various quantities of lecithin and cholesterol (60-0), (50-10), (40-20), (30-30) by thin-film hydration-sonication method. Various testes such as zeta-potential, turbidity and rheology were carried out to determine physicochemical properties of liposomes. The physical stability of the prepared formulations, evaluated by measuring the average particle size and the remaining vitamin D₃ in nanoliposomes during storage, over 30 days at 4°C.

Results: Zeta-potential results showed that inclusion of cholesterol in liposome caused to increase of negative zeta-potential from -29 to -42.9 mv. The samples containing cholesterol showed no significant changes in mean diameter volume and the amount of vitamin loaded liposome, during this period. The incorporation of cholesterol into the phospholipid bilayer increased the turbidity. All liposome samples showed Newtonian behavior at all concentration of lecithin- cholesterol.

Conclusions: The applied method in this study has been efficient method for encapsulation of vitamin D₃, reduction of size in the nonometric range, a narrow size distribution, physical stability and else properties.

Keywords: Nanoparticles, Liposome, Cholecalciferol, Zeta potential, Rheology

*Corresponding author:

E-mail: hamishehkar.hamed@gmail.com

مقاله پژوهشی

بررسی ویژگی های پایداری، پتانسیل زتا و رئولوژی نانولیپوزومهای حامل ویتامین D₃

مریم محمدی^۱، بابک قنبرزاده^۲، رضا رضایی مکرّم^۳، محمد یار حسینی^۴، حامد همیشه کار*^۴

^۱مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۲گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
^۳گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
^۴مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۲/۷/۲۰ پذیرش: ۹۲/۹/۲۴

چکیده

زمینه و اهداف: ویتامین D یک ترکیب با ساختار استروئیدی و یک ویتامین محلول در چربی است که نقش مهمی را در ماتریکس غضروف و استخوانها ایفا می کند. غنی سازی مواد غذایی با ویتامینهای محلول در چربی آسان نیست. چون این ویتامینها، در محلولهای آبی مثل نوشیدنیها، قابلیت پخش شدن کمی دارند. درون پوشانی ترکیبات غذا- دارو توسط حاملهای لیپیدی مانند لیپوزومها، یک روش مؤثر برای حفاظت ویژگیهای ذاتی آنها در طی دوره نگهداری است. هدف این کار تحقیقی، تولید و آماده سازی نانولیپوزومهای حاوی ویتامین D₃، تعیین ویژگیهای مختلف آنها و مطالعه بر روی پایداری فرمولاسیون آماده سازی شده است.

مواد و روش ها: نانولیپوزومهای حاوی ویتامین D₃، با استفاده از غلظتهای متفاوت لستین-کسترو (۰-۶۰، ۱۰-۵۰، ۲۰-۴۰ و ۳۰-۳۰) و توسط روش هیدراسیون لایه نازک- سونیکاسیون تهیه شدند. آزمونهای پتانسیل زتا، کدورت و خواص رئولوژیکی برای تعیین خواص فیزیکوشیمیایی نمونه ها انجام گرفت. پایداری فیزیکی توسط اندازه گیری اندازه ذرات و مقدار ویتامین باقیمانده در طی مدت نگهداری به مدت یک ماه در ۴°C تعیین شدند.

یافته ها: نتایج پتانسیل زتا نشان داد که با ورود کسترو به ساختار، پتانسیل زتا از ۲۹- به ۴۲/۸- افزایش یافت. نمونه های دارای کسترو طی نگهداری از نظر اندازه و مقدار ویتامین لود شده، دچار تغییرات چندانی نگردیدند. با ورود کسترو به دولایه ای فسفولیپیدی، کدورت سیستم افزایش یافت. همچنین، محلول های لیپوزومی در تمامی غلظت های لستین- کسترو دارای رفتار نیوتنی بودند.

نتیجه گیری: روش مورد استفاده در این تحقیق، از نظر انکسولاسیون ویتامین D₃، کاهش ذرات در مقیاس نانو و توزیع اندازه ذرات باریک و تک مد، ایجاد پایداری در طول زمان و دیگر خصوصیات مورد انتظار روش مناسبی بوده است.

کلید واژه ها: نانوذرات، لیپوزوم، ویتامین D₃، پتانسیل زتا، رئولوژی

* ایمیل نویسنده رابط: hamishehkar.hamed@gmail.com

مقدمه

بیشتر در منابع حیوانی (تخم مرغ، شیر، کره، روغن کبد ماهی) یافت می شود و منابع گیاهی منابع فقیری از نظر آن هستند. کارشناسان علم تغذیه معتقدند که تعداد بسیار کمی از افراد، ویتامین D خود را از طریق غذا تأمین می کنند و به منظور تأمین ویتامین D مورد نیاز، افراد باید در معرض نور آفتاب قرار بگیرند. اما قرار گرفتن بیش از اندازه در مقابل آفتاب، بدلیل اثرات مضر پرتو فرابنفش، زیان آور است. درون پوشانی ویتامین D در حاملهای

ویتامین D، یک ویتامین محلول در چربی است و به شکل های متعددی در مواد غذایی وجود دارد. رایج ترین شکلها، کولی کلسیفرول (D₃) و ارگوکلسیفرول (D₂) می باشند. نقش اصلی ویتامین D در بدن، افزایش جذب کلسیم و فسفر در روده و بازجذب آن در کلیه می باشد (۱ و ۲). منبع اصلی ویتامین D مورد نیاز انسان، ۷ دئیدروکستروئید موجود در سلولهای پوست است که در اثر تابش نور فرابنفش، به ویتامین D₃ تبدیل می شود. ویتامین D

پایداری میکروبی خوبی (طی مدت ۳۷ روز و در دمای ۴°C) نشان داد. آنها همچنین اعلام کردند که اسید استئاریک می تواند جایگزین خوبی برای کلسترول در فرمولاسیون لیپوزومی باشد. کو و همکاران (۱۱)، بر روی پایداری نانولیپوزومهای حاوی رتینول (تولید شده به روش هیدراسیون لایه نازک- اکستروژن) تحت شرایط تاریکی و نور UV و در دماهای (۴، ۲۵، ۳۷ و ۵۰ درجه سانتیگراد) تحقیقاتی انجام دادند. نتایج نشان داد که پایداری نانو-لیپوزومهای حاوی رتینول تحت شرایط تاریکی و نور UV افزایش یافت. رتینول در دماهای بالاتر سریعتر تجزیه شد و بیشترین حفاظت نانولیپوزوم در دمای ۴°C و تحت شرایط تاریکی به دست آمد که احتمالاً به دلیل کاهش نفوذ پذیری غشا نسبت به اکسیژن، نور و کاهش اکسیداسیون و هیدرولیز فسفولیپید بود. با توجه به مطالعات انجام شده، نانولیپوزومها پتانسیل خوبی را برای غنی سازی مواد غذایی با ترکیبات زیست فعال آبریز دارا هستند. هدف کار تحقیقی حاضر، آماده سازی نانولیپوزومهای حاوی ویتامین D₃ با استفاده از روش هیدراسیون لایه نازک-سونیکاسیون و بررسی پایداری کلئیدی و قابلیت حفاظت کنندگی آنها از ویتامین D₃ می باشد.

مواد و روشها

فسفولیپید (ال-آلفا- لستین گرانولار با درجه خلوص ۹۸٪، شرکت Across آمریکا)، کلسترول (با درجه خلوص ۹۵٪، - شرکت Merck آلمان، ویتامین D₃ (شرکت DSM، فرانسه)، سایر مواد از شرکت مواد شیمیایی مرک (Chemical Co. Merck Darmstadt, Germany) تهیه شدند.

تولید و آماده سازی نانولیپوزومهای حاوی ویتامین D₃

ابتدا غلظتهای متفاوت از لستین-کلسترول (۳۰-۳۰، ۴۰-۲۰، ۵۰-۱۰ و ۶۰-۰) در حلالهای ترکیبی از کلروفرم-متانول با نسبت ۱:۲ حل شد. بعد ویتامین D₃ به مخلوط لستین-کلسترول در یک فلاسک ته گرد ۵۰ ml اضافه شد. حلال در یک اواپراتور روتاری (شرکت Heidolph، کشور آلمان) در ۳۰°C تبخیر شد. بعد لایه نازک تشکیل شده با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل هیدراته شد و دانکهای شیشه ای برای کمک به هیدراته شدن لایه نازک لیپیدی اضافه شد. در این مرحله لیپوزومهای مولتی لاملار (Multilamellar) میکرومتری تولید شدند. در ادامه نمونه ها در هموژنایزر (شرکت Heidolph، کشور آلمان) با سرعت ۲۰۰۰ rpm در دمای بالای انتقال فاز لیپوزومها به مدت ۱۰ دقیقه هموژنایز شدند. بعد مخلوط لیپوزومی در داخل حمام یخ (جهت جلوگیری از اعمال انرژی زیاد به داخل محلول و جلوگیری از هیدرولیز و اکسیداسیون لیپید) به سونیکاتور پروب مدل (Materials & Sonics vibracell، کشور انگلستان) منتقل شد و ۵ سیکل ۱ دقیقه ای با ۳ دقیقه استراحت ما بین سیکلها بر روی نمونه ها اعمال شد. در این مرحله نانولیپوزومهای یونی لاملار (Unilamellar) تولید شدند.

کلئیدی و غنی سازی مواد غذایی و بویژه نوشیدنی ها می تواند راه حل مناسبی برای تأمین آن باشد (۳). انکپسولاسیون (درون-پوشانی)، تکنیکی است که طی آن، ذرات کوچک جامد و قطرات مایع، درون یک پوشش نازک قرار می گیرند و در نتیجه، انتشار آنها کنترل شده و در برابر تخریب و تجزیه محافظت می شوند (۴). بر حسب اندازه ذرات تولید شده، می توان درون پوشانی را به دو نوع میکرو و نانو تقسیم بندی کرد. ذرات دارای اندازه نانو، دارای مزایای متعددی نسبت به ذرات میکرو هستند. از جمله اینکه، با کاهش اندازه ذرات به مقیاس نانو و در نتیجه افزایش نسبت سطح به حجم، ویژگی های مختلف مواد از جمله قابلیت دسترسی زیستی، حلالیت در آب، پایداری کلئیدی و شفافیت محلول های حاوی نانوذره، افزایش می یابد (۵). نانوحامل های مورد استفاده در صنایع غذایی و دارویی را می توان به دو دسته نانوکپسول های بیوپلیمری و نانوکپسول های لیپیدی تقسیم کرد. اگرچه نانوحامل های بیوپلیمری فواید بسیار دارند اما امکان صنعتی شدن کامل آنها به علت به کارگیری فرایندهای گرمایی یا شیمیایی پیچیده مختلف که به طور کامل قابل کنترل نیستند، مشکل است. ولی نانوحامل های لیپیدی، امکان تولید در مقیاس صنعتی را دارند و دارای کارایی انکپسولاسیون بالا و سمیت پایین هستند. نانوحامل های بر پایه لیپیدی شامل نانو لیپوزومها، نانونیوزومها، نانوامولسیونها، میسلهای سورفاکتانت ها (میکرو امولسیون ها) و ذرات لیپیدی جامد می باشند (۶). نانولیپوزومها، ذرات کروی تشکیل شده از لیپیدهای قطبی (فسفولیپیدها و گلیکولیپیدها) هستند. فسفولیپیدها، آمفی فیل (دارای هر دو گروه آبدوست و آبریز) هستند و به محض واکنش با آب به صورت سازمان یافته و به شکل غشاهای دو لایه ای تجمع می یابند و در اثر وارد شدن انرژی و نیروی برشی (هموژنیزاسیون، سونیکاسیون) بصورت کروی (وزیکول) در می آیند (۷). علاوه بر مولکول های فسفولیپیدی، نانولیپوزومها ممکن است حاوی مولکول های دیگر مثل استرولها در ساختار خود باشند. استرولها یکی از اجزای مهم در ساختار غشاهای طبیعی هستند و وارد کردن آنها در ساختار نانولیپوزومها باعث تغییرات مهمی در خصوصیات آنها می شود. کلسترول، استرولی است که به طور گسترده در ساختار وزیکول های لیپیدی استفاده می شود و با تعدیل کردن سیالیت دو لایه های لیپیدی باعث افزایش پایداری وزیکول های لیپیدی می شود (۸). لیپوزومها می توانند مواد فعال آب دوست را در درون و سطح و مواد آبریز را در میان غشا، انکپسوله کنند (۹). در سالهای اخیر، تحقیقات متعددی برای توسعه کاربرد لیپوزومها در غنی سازی مواد غذایی با ویتامینها و ترکیبات غذا- دارو (نوتریسیوتیکال) صورت گرفته است. در پژوهشی مارساناسکو و همکاران (۱۰)، بر روی لیپوزومهای حاوی ویتامین E و C (تولید شده به روش هیدراسیون لایه نازک) جهت کاربرد در غنی سازی آب پرتقال مطالعه کردند. آنها به منظور افزایش پایداری لیپوزوم، از اسید استئاریک به جای کلسترول استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد که افزودن فرمولاسیون لیپوزومی به آب پرتقال، تغییری در خصوصیات ارگانولپتیکی محصول ایجاد نکرد و آب پرتقال

روش های آزمون

پتانسیل زتا

برای تعیین پتانسیل زتای لیپوزوم ها و نمونه های حاوی ویتامین D_۲ از دستگاه زتا سایزر (Nano-ZS ساخت شرکت Malvern کشور انگلستان) استفاده شد. نمونه ها نخست با استفاده از آب مقطر ۵۰ برابر رقیق شدند. برای این منظور، هریک از نمونه ها نخست با استفاده از آب مقطر ۵۰ برابر رقیق شدند. سپس نمونه ها توسط سرنگی داخل لوله موئین منتقل و لوله موئین در محل مخصوص در داخل دستگاه قرار گرفت. اندازه گیری پتانسیل زتا محلول لیپوزومی در pH=۷/۴ و در دمای ۲۵ °C و توان ۱۴۹ وات انجام شد (۱۲).

پایداری

به منظور بررسی پایداری فیزیکی سیستم، محلول های لیپوزومی تهیه شده در تیوپهای ۵۰CC ریخته شده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. اندازه ذرات در بازه های زمانی (۱، ۱۵ و- ۳۰ روز)، توسط دستگاه آنالیز کننده ذرات (مدل SALD 2101 ساخت ژاپن) بر اساس روش تفرق نور لیزر اندازه گیری شدند.

تعیین پایداری ویتامین D_۲ در لیپوزوم ها طی نگهداری

به منظور بررسی میزان پایداری و حفظ ویتامین D طی نگهداری، محلول های لیپوزومی تهیه شده در تیوپهای ۵۰CC ریخته شده و در دمای ۴°C نگهداری شدند. در بازه های ۱، ۱۵ و ۳۰ روز، مقدار ویتامین باقیمانده در حامل لیپوزومی بعد از استخراج با کلروفرم با استفاده از دستگاه HPLC (مدل Knauer، ساخت کشور آلمان) تعیین شد. به این ترتیب که ابتدا غلظتهای ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ ماکرولیتر در هر میلی لیتر از ویتامین D_۲ تهیه شد و به دستگاه HPLC تزریق شد. سطح زیر منحنی آنها محاسبه شد و با استفاده از نرم افزار Excel منحنی استاندارد به دست آمد. بعد سطح زیر منحنی حاصل از پیک نمونه، در معادله به دست آمده از منحنی استاندارد گذاشته شد و غلظت ویتامین باقیمانده از رابطه (۱) محاسبه شد (معادله ۱) (۱۳).

اندازه گیری کدورت

کدورت نانولیپوزومهای حاوی ویتامین، در دستگاه اسپکتوفتومتر نور مرئی مدل Ultrospec 2000 ساخت انگلیس و در عدد موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شدند. ابتدا یک میلی لیتر از نمونه با ۲ میلی لیتر آب مقطر رقیق شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. بعد نمونه ها در سل مربوط به اسپکتوفتومتر ریخته شد و کدورت نمونه ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شدند (۱۴).

آزمون رئولوژیکی

اندازه گیری ویژگی های رئولوژیکی نمونه های کمپلکس، یک روز پس از آماده سازی نمونه ها، در دمای ۲۵°C و با استفاده از دستگاه رئومتر Physica Anton Paar (مدل MCR 301، ساخت اتریش)، مجهز به رئومتری استونه ای هم مرکز با قطر پروب های ۲/۵ سانتیمتر برای استوانه داخلی و ۲/۷ سانتیمتر برای استوانه خارجی

انجام شد. برای اندازه گیری تنش برشی و گرانیوی به صورت تابعی از سرعت برشی و تعیین نوع رفتار جریانی نمونه ها، در یک فاصله زمانی ۱۰ دقیقه، سرعت برشی از ۲S⁻¹ به ۱۰۰S⁻¹ رسید.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمون ها در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. تحلیل و ارزیابی (ANOVA) با استفاده از مدل خطی (G.L.M) نرم افزار آماری SPSS در سطح احتمال ۵٪ (P<۰/۰۵) و آزمون چند دامنه ای دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین ها انجام گرفت.

نتایج

پتانسیل زتا

پتانسیل الکتریکی در لایه سطحی (Interfacial) بین لایه باردار غیرمتحرک (ساکن یا استرن) و لایه متحرک اطراف ذرات و قطرات کلئیدی، پتانسیل زتا نامیده می شود. به عبارت دیگر، پتانسیل زتا، اختلاف پتانسیل بین لایه باردار ساکن و بقیه فاز پیوسته است. پتانسیل زتا بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطحی سیستم های کلئیدی است چون نشان دهنده میزان تجمع بار در لایه غیرمتحرک و شدت جذب یون های مخالف به سطح ذره و در نتیجه میزان پایداری الکترواستاتیک است. پتانسیل زتا بصورت مستقیم قابل اندازه گیری نیست و از روی تحرک الکتروفوریتیک تعیین می شود. کاهش اختلاف پتانسیل زتا به زیر مقدار بحرانی، موجب درهم ریختن لایه دو گانه باردار اطراف ذرات و تجمع ذرات می شود. مقادیر پتانسیل زتا حدود ۲۵ میلی ولت (بصورت مثبت یا منفی) معمولاً به عنوان معیاری برای تفکیک سطوح ذرات با بار الکتریکی بالا و پایین در نظر گرفته می شود.

$$\text{میزان پایداری} = \frac{\text{مقدار ویتامین D}_2 \text{ باقیمانده در لیپوزوم}}{\text{مقدار ویتامین D}_2 \text{ کپسوله شده اولیه}} \times 100$$

کلئیدهای حاوی ذرات با پتانسیل زتای پایین (مثبت یا منفی)، در صورت عدم وجود فاکتورهای بازدارنده دیگر مانند ویسکوزیته بالا و ممانعت فضایی، استعداد زیادی به لخته و توده شدن خواهند داشت (۱۵). در این پژوهش، برای مشخص شدن میزان نیروهای دافعه الکترواستاتیک بین نانولیپوزومهای بدون ویتامین و نانولیپوزومهای حاوی ویتامین و همچنین میزان پایداری فرمولاسیون ناشی از آن، از نتایج تحرک الکتروفوریتیک و پتانسیل زتا استفاده شد. نتایج حاصل از پتانسیل زتا نانولیپوزومهای بدون ویتامین و با ویتامین در جدول ۱ آمده است. همان طور که مشاهده می شود تمامی لیپوزومها دارای پتانسیل زتای بالای ۲۵ mV- هستند که مطلوب است. پتانسیل زتای نانولیپوزوم بدون کلسترول و ویتامین ۲۹ mV- بود که عمدتاً به دلیل یونیزاسیون گروه های فسفات موجود در لسیتین می باشد. با افزودن کلسترول به ساختار، پتانسیل زتا افزایش یافت. با کپسوله شدن ویتامین در نانولیپوزوم و در مقایسه هر تیمار با نوع بدون ویتامین آن، پتانسیل زتا یا بدون تغییر ماند یا افزایش جزئی داشت.

جدول ۱: پتانسیل زتا و پارامترهای رئولوژیک مدل قانون توان نانولیپوزومها

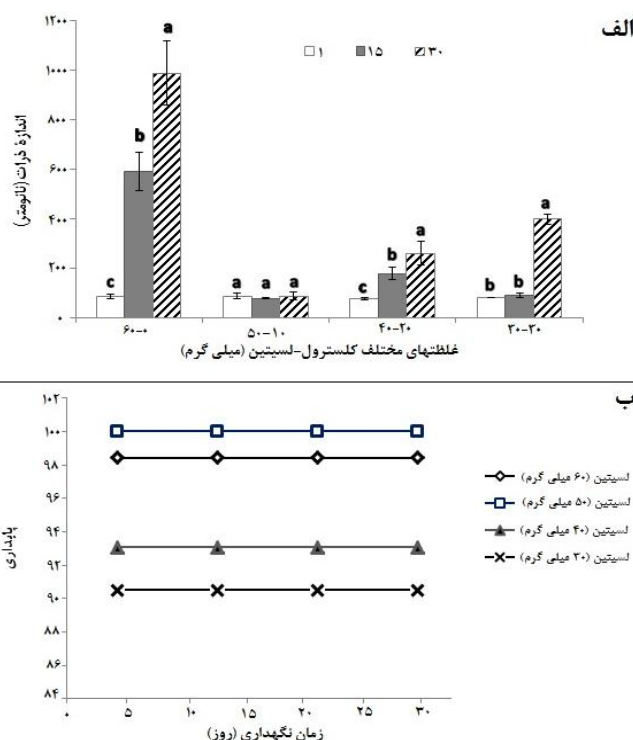
ترکیبات تشکیل دهنده لیپوزوم	پتانسیل زتا (mV)	پارامترهای رئولوژیک مدل قانون توان		
لستین به کلسترول (mg)	بدون ویتامین	شاخص جریان (n)	ضریب قوام (K) (Pa.s)	R ²
۶۰ به ۰	-۲۹/۶	۰/۹۶	۰/۲۶	۰/۹۹۵۳
۵۰ به ۱۰	-۴۰/۵	۰/۸۷	۱/۶۶	۰/۹۹۹۶
۴۰ به ۲۰	-۴۱/۶	۰/۸۷	۱/۶۰	۰/۹۹۶۶
۳۰ به ۳۰	-۴۲/۹	۱/۳۳	۱/۱۶	۰/۹۹۹۶

بررسی پایداری

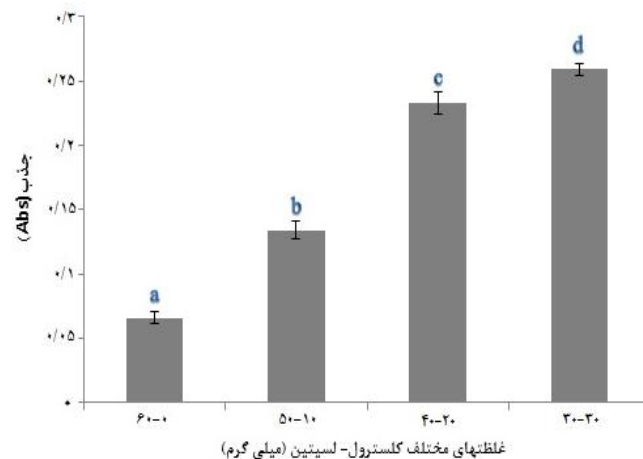
شکل ۱- الف اندازه ذرات بعد از مدت یک ماه در دمای ۴°C را نشان می دهد. همان طور که ملاحظه می شود در نمونه بدون کلسترول بین روزهای (۱، ۱۵، ۳۰) در سطح ۵٪ تفاوت معنی دار وجود داشت و نسبت به بقیه تیمارها، افزایش بیشتری در اندازه ذرات بعد از گذشت ۳۰ روز ملاحظه شد. در نمونه لستین- کلسترول با نسبت ۵۰ به ۱۰ بین هیچ کدام از روزها تفاوت معنی دار ملاحظه نشد و نسبت به تیمارهای دیگر اندازه ذرات بعد از گذشت ۳۰ روز تقریباً بدون تغییر ماند. در نمونه لستین- کلسترول با نسبت ۴۰ به ۲۰ نیز مانند تیمار اول بین روزهای (۱، ۱۵، ۳۰) در سطح ۵٪ تفاوت معنی دار وجود داشت ولی نسبت به تیمار اول بعد از گذشت یک ماه افزایش زیادی در اندازه ذرات ملاحظه نشد و ذرات همچنان اندازه های نزدیک به مقیاس نانو (۲۶۲ nm) داشتند. در نمونه آخر یعنی لستین- کلسترول با نسبت ۳۰ به ۳۰ بین روزهای ۱ و ۷ در سطح ۵٪ تفاوت معنی دار وجود نداشت

کدورت

شکل ۲ مقادیر کدورت برای ۴ غلظت متفاوت لستین- کلسترول نشان می دهد. همان طور که ملاحظه می شود با افزایش میزان کلسترول، کدورت به طور معنی داری افزایش یافته است.



شکل ۱- الف: تأثیر زمان نگهداری (۱، ۱۵، ۳۰ روز) بر اندازه ذرات و ب: پایداری درون پوشانی ویتامین D₃ در غلظت های مختلف لستین - کلسترول (حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ در آزمون دانکن است)

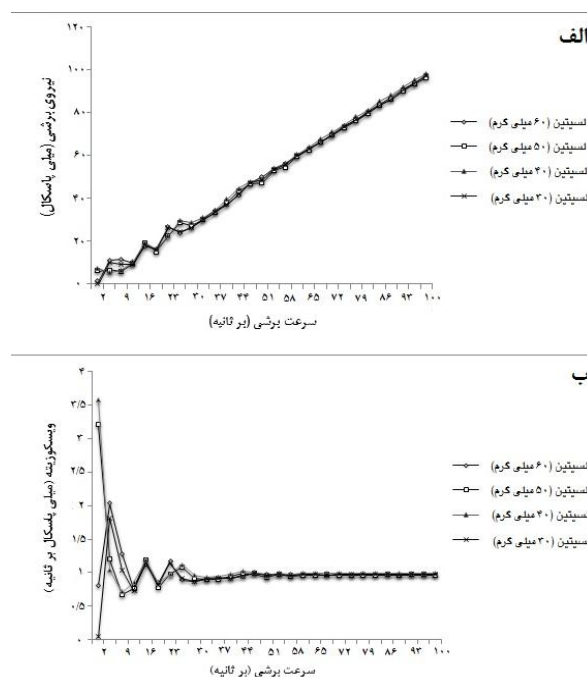


شکل ۲: مقادیر کدورت اندازه‌گیری شده برای ۴ غلظت متفاوت لسیترین- کلسترول (حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف در سطح ۵٪ در آزمون دانکن است).

آزمون‌های رئولوژیکی پایا

در آزمون رئولوژیکی پایا، رفتار جریان غلظت‌های مختلف لسیترین- کلسترول (۶۰-۳۰، ۵۰-۱۰، ۴۰-۲۰، ۳۰ میلی گرم) مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور، ارتباط تنش برشی و ویسکوزیته به صورت تابعی از سرعت برشی، برای تعیین نوع رفتار جریانی نمونه‌ها در فاصله زمانی ۱۰ دقیقه و سرعت برشی (S^{-1}) ۱۰۰-۲ اندازه‌گیری شد. همانطور که در شکل ۳-الف مشاهده می‌شود، بین تنش برشی و سرعت برشی در غلظت‌های مختلف لسیترین- کلسترول رابطه نسبتاً خطی وجود دارد و این رفتار نشان می‌دهد که محلول‌ها دارای ساده‌ترین رفتار جریانی، یعنی رفتار نزدیک به نیوتنی هستند. در این سیالات، شیب خط نمودار تنش برشی- سرعت برشی، ویسکوزیته را نشان می‌دهد،

بطوریکه با افزایش ویسکوزیته محلول، شیب منحنی نیز افزایش می‌یابد. شکل ۳-ب اثر غلظت‌های مختلف لسیترین- کلسترول را بر ویسکوزیته، در سرعت‌های برشی متفاوت نشان می‌دهد. با توجه به شکل مشاهده می‌شود که ویسکوزیته همه نمونه‌ها در یک گستره بوده و در غلظت‌های (۴۰-۲۰ و ۵۰-۱۰) در سرعت‌های برشی پایین، یک افت شدید در مقدار ویسکوزیته وجود دارد، که می‌توان این مقدار افت اولیه را به کاهش اصطکاک در اثر هم‌مسیر شدن ذرات فاز پراکنده و غلبه نیروی برشی بر نیروی براونی نسبت داد. نمودارهای ویسکوزیته- سرعت برشی نشان داد که ویسکوزیته به سرعت برشی وابسته نیست و افزایش سرعت برشی، تأثیر چندانی بر ویسکوزیته محلول‌ها ندارد. همچنین، نمونه‌ها از نظر ویسکوزیته تفاوت چندانی نداشتند.



شکل ۳-الف: نمودار تنش برشی- سرعت برشی و ب: ویسکوزیته- سرعت برشی نانولیپوزومهای لسیترین- کلسترول حاوی ویتامین D_۲ در غلظت‌های مختلف (۶۰ به ۳۰، ۵۰ به ۱۰، ۴۰ به ۲۰، ۳۰ به ۳۰ میلی گرم)

دهد و باعث دوباره قرارگیری و آرایش مجدد ساختارهای لیپیدی غشا شود و از این طریق پتانسیل زتا، پایداری و دیگر خصوصیات غشا را تحت تأثیر قرار دهد و گرانه ویتامین در شرایط آزمایش یونیزه نمی شود و تأثیر آن در پتانسیل زتا از طریق تغییر ریزساختارهای غشاست. در تحقیق انجام گرفته در مواردی که پتانسیل زتا افزایش یافته است احتمالاً به این دلیل بوده است که با حضور ویتامین در غشا و به دلیل شباهت داشتن ساختار آن به کلسترول، گروه هیدروکسیل ویتامین با گروه کولین فسفولیپید پیوند هیدروژنی تشکیل داده و به داخل غشا کشیده شده است و گروه فسفاتیدیل به سطح غشا آمده و باعث افزایش پتانسیل زتا شده است. از طرفی دیگر مطالعات نشان داده است که ویتامین D₃ نسبت به کلسترول پیوند ضعیفتری با غشا ایجاد می کند، بنابراین نسبت به کلسترول با سرعت بالاتری می تواند بین غشاهای فسفولیپیدی مبادله شود (۱۸). بنابراین نسبت به کلسترول به مقدار کمتری پتانسیل زتا را تحت تأثیر قرار داده است. در پژوهشی محمدحسینی و همکاران (۱۹)، شاخص پتانسیل زتای لیپوزومهای حاوی گامااوریزانول و بدون آن را مقایسه کردند، تا تأثیر ماده فعال بر بار سطحی نانولیپوزومها مشخص شود. نتایج نشان داد که افزودن گامااوریزانول باعث افزایش جزئی پتانسیل زتای منفی از ۱۹/۴- به ۲۰/۴- میلی ولت شد. پاداموار و همکاران (۲۰)، با کپسوله کردن ویتامین E در لیپوزومهای لستین- کلسترول، مشاهده کردند که پتانسیل زتای وزیکولهای تولید شده افزایش یافت. در پژوهشی دیگر مورا و همکاران (۲۱)، افزایش پتانسیل زتای نانولیپوزومهای لستین- کلسترول حاوی داروی بنزوکینون را به یونیزاسیون گروه های فسفات فسفولیپید نسبت دادند. آنها بر این عقیده بودند که پتانسیل زتا به ندرت تحت تأثیر داروی درون پوشانی شده در حامل، غلظت دارو و شرایط افزودن دارو در طول آماده سازی وزیکولها قرار می گیرد.

بررسی پایداری اندازه ذرات طی نگهداری

علاوه بر پتانسیل زتا، یکی از معیارهای پایداری سیستمهای کلوئیدی از جمله لیپوزومها، پایداری اندازه ذرات با گذشت زمان می باشد. افزایش اندازه ذرات به بیش از یک میکرومتر و کاهش در تعداد ذرات در طول زمان می تواند نشانگر ناپایداری فیزیکی باشد. به علت اینکه چگالی لیپیدهای قطبی (که ماده اصلی تشکیل دهنده لیپوزومها هستند)، به چگالی آب نزدیک است، پدیده تفکیک گرانشی (رونشینی) که عامل مهمی در ناپایداری فیزیکی امولسیونها به شمار می آید، در لیپوزومها کمتر دیده می شود. پدیده انبوهش (Flocculation) و هم آمیختگی (Coalescence) مکانیسمهای اصلی ناپایداری در لیپوزومها محسوب می گردند. در طی انبوهش، نیروهای جذبی (واندروالس) وزیکولها باعث چسبیدن آنها به هم و تشکیل واحدهای بزرگتر می شود. در واقع این فرایند با وارد کردن نیروهای ملایم برگشت پذیر است. در صورت پیشرفت فرایند انبوهش، لیپوزومها باهم آمیخته شده (کوالنس) و لیپوزومهای بزرگتر را ایجاد می نمایند (۲۲).

برای بررسی بیشتر رفتار رئولوژیکی از مدل قانون توان استفاده شد. در جدول ۱، مقادیر شاخص جریان (n) و ضریب قوام (k) بدست آمده از مدل قانون توان و همچنین ضریب تبیین R² برای تمام نمونه های آزمایشی با درصدهای مختلف، نشان داده شده است. ضریب تبیین R² برای اکثر نمونه های ارزیابی شده، بالای ۹۹٪ بود که نشان دهنده مناسب بودن مدل قانون توان برای توصیف خصوصیات جریان نانولیپوزومها می باشد. در این رابطه، هر چه n به عدد یک نزدیک تر باشد، نشانه تمایل سیال به رفتارهای نیوتنی و هر چه به صفر نزدیک تر باشد، نشانه تمایل سیال به رفتار سودوپلاستیک است. با توجه به جدول ۱، مشاهده می شود که مقادیر شاخص رفتار جریانی برای تمام نمونه ها، بالاتر از ۰/۸ است که دلالت بر نزدیکی به رفتار نیوتنی و رفتار ضعیف سودوپلاستیک دارد.

بحث

پتانسیل زتا

با افزودن کلسترول به ساختار، پتانسیل زتا افزایش یافت. با توجه به اینکه کلسترول یک مولکول خنثی است بار منفی روی ذرات احتمالاً به این دلیل افزایش یافته است که با ورود کلسترول در ساختار لیپوزوم، گروه هیدروکسیل موجود در سر کلسترول با گروه کولین موجود در سر قطبی فسفاتیدیل کولین پیوند هیدروژنی برقرار می کند و گروه کولین که دارای بار مثبت می باشد به داخل غشا و گروه فسفاتیدیل که دارای بار منفی است، به سطح غشا کشیده می شود و باعث افزایش بار منفی و دفع الکترواستاتیک ذرات می شود (۱۶). در پژوهشی مشابه لئو و همکاران (۱۷)، بر روی تأثیر کلسترول بر پایداری فیزیکی لیپوزومهای متشکله از لستین مطالعاتی را انجام دادند. نتایج آنها نشان داد که پتانسیل زتا و دفع الکترواستاتیک بین لیپوزومهای فسفاتیدیل کولین با افزودن کلسترول افزایش یافت. در تحقیقی دیگر ایکسیا و همکاران (۱۴)، بر روی تأثیر کلسترول بر پایداری الکترواستاتیک نانولیپوزومهای بدون ماده فعال (فروسولفات) مطالعاتی را انجام دادند. نتایج آنها نشان داد که وقتی کلسترول تا غلظت ۱۰٪ مولی اضافه می شود بار منفی روی ذرات و دافعه الکترواستاتیک افزایش می یابد که دلیل آن را به برقراری پیوند بین گروه هیدروکسیل کلسترول و کولین لستین و ایجاد کشش دو قطبی بین آنها نسبت دادند ولی وقتی غلظت کلسترول از ۱۰٪ بیشتر شد پتانسیل زتا کاهش یافت که دلیلی برای آن ارائه نشده بود.

با کپسوله شدن ویتامین در نانولیپوزوم و در مقایسه هر تیمار با نوع بدون ویتامین آن، پتانسیل زتا یا بدون تغییر ماند یا افزایش جزئی داشت. وقتی ویتامین در ترکیب لستین- کلسترول حل می شود و در داخل دولایه لیپیدی قرار می گیرد، زنجیره های آسیل فسفولیپیدی یک محیط مطلوب برای مولکولهای ویتامین فراهم می کنند. به هر حال قرارگیری ویتامین در دو لایه های فسفولیپیدی ممکن است ریز ساختارهای دو لایه فسفولیپیدی را تغییر دهد. به عبارتی ویتامین می تواند با غشای فسفولیپیدی واکنش

دولایه‌ای و سفت شدن آن منجر به حفظ آن‌ها در لیپوزوم‌ها می‌شود (۲۴).

با گذشت زمان در همه فرمولاسیون‌ها، تغییر معنی داری در مقدار ویتامین D_2 درون پوشانی‌شده ایجاد نشد که می‌توان به دلایل زیر نسبت داد:

۱- با افزودن کلسترول، وزیکول‌ها به علت برقراری پیوند کلسترول با گروه کولین فسفولیپید و پر کردن فضاهای ایجاد شده توسط زنجیره‌های آسیل فسفاتیدیل کولین ساختار سفت‌تر و پایداری بیشتری را در برابر تنش‌های برشی وارد شده خواهند داشت. همچنین، افزودن کلسترول به ساختار، منجر به کاهش نفوذ پذیری غشای لیپوزومی و افزایش ماندگاری ویتامین درون پوشانی شده می‌گردد.

۲- دلیل دیگر پایداری ماده درون پوشانی شده طی مدت یک ماه، ماهیت لیپوفیلی ماده درون پوشانی شده است که موجب قرارگیری آن در دو لایه فسفولیپیدی می‌شود (بر خلاف ترکیبات آبدوست). با قرارگیری ویتامین در دولایه فسفولیپیدی، زنجیره‌های آسیل فسفولیپید محیط مناسبی برای آن فراهم می‌کند و از اکسیداسیون و تجزیه هیدرولیکی در امان خواهند بود. همچنین همان طور که گفته شد وقتی ماده آبریز در دولایه لیپیدی قرار می‌گیرد، بسیاری از ویژگی‌های لیپوزوم از جمله پایداری آن تحت تأثیر قرار می‌گیرد که در مورد تحقیق انجام گرفته، با توجه به شبیه بودن به ساختار کلسترول احتمالاً تا حدودی باعث افزایش پایداری شده است. فاتروس و همکاران (۲۵)، نشان دادند که دو داروی آبریز هیدروکاروتیازید و کلروتیزید به دلیل نوع ساختار و چیدمانشان، سفتی غشاء لیپوزوم را تحت تأثیر قرار دادند و منجر به حفظ ماده فعال انکپسوله در لیپوزوم‌ها شدند. راستی و همکاران (۲۶)، پایداری لیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌های حاوی امگا سه تولید شده به روش هیدراسیون لایه نازک- سونیکاسیون در طی زمان نگهداری ۷-۳۰۰ روز در دمای را بررسی کردند و نشان دادند که تغییر ناچیزی در اندازه ذرات و درصد انکپسولاسیون امگاسه در زمان نگهداری دیده شد.

۳- یک دلیل دیگر پایداری ویتامین درون پوشانی شده طی مدت نگهداری را می‌توان به نگهداری فرمولاسیون در تاریکی و دور از نور اشاره کرد. نور و اکسیژن نفوذپذیری غشا را افزایش داده و باعث افزایش رهاسازی ویتامین درون پوشانی شده می‌شود.

در پژوهشی دیگر محمدحسینی و همکاران (۱۹)، بر روی پایداری نانولیپوزوم‌های حاوی گامااوریزانول نگهداری شده به مدت ۶۰ روز در 4°C مطالعاتی را انجام دادند. نتایج آنها نشان داد که تفاوت چشمگیری در اندازه ذرات بعد از دو ماه نگهداری در دمای 4°C مشاهده نشد. همچنین مقادیر ماده کپسوله‌شده باقیمانده طی این مدت تغییر چندانی نکرد. آنها پایداری ایجاد شده را به دو عامل حضور گاما اوریزانول در دولایه لیپیدی غشا و ایجاد تعادل در سیالیت غشا (به دلیل داشتن ساختار شبیه به کلسترول) و ممانعت فضایی ایجاد شده توسط پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ نسبت دادند.

به نظر می‌رسد که سه عامل کلسترول، ویتامین D_2 و دمای پایین موجب پایداری اندازه وزیکول‌ها شده است. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، پتانسیل زتای نانولیپوزوم بدون کلسترول تقریباً 29 mV است ولی نمونه لستین بدون کلسترول با وجود داشتن خاصیت سورفکتانتی و با وجود داشتن بار منفی و دافعه الکترواستاتیک بین ذرات نتوانست پایداری کاملی که در این تحقیق مورد انتظار بود به دست آورد. در این تحقیق، به منظور افزایش پایداری سیستم، از کلسترول در ساختار نانولیپوزوم‌ها استفاده شد. همان طور که گفته شد کلسترول باعث افزایش دافعه الکترواستاتیک شده و از انبوهش جلوگیری می‌کند و از طرف دیگر با افزایش سفتی غشا از فرایند به هم آمیخته شدن (کوالسنس) جلوگیری می‌کند. یک دلیل دیگر جهت پایداری بودن نسبی اندازه نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین بعد از مدت یک ماه را می‌توان به دمای نگهداری (4°C) و نگهداری نمونه‌ها در تاریکی نسبت داد. افزایش دما منجر به تغییر در ساختار کریستالین لیپید، نرم شدن غشا و کاهش پتانسیل زتا می‌شوند که منجر به کاهش نیروی دفعی بین ذرات و توده‌ای شدن ذرات می‌شود. در واقع رابطه خطی بین لگاریتم سرعت هیدرولیز فسفولیپید و عکس دمای تشکیل لیپوزوم از فسفاتیدیل کولین وجود دارد (۲۳). دلیل دیگر پایداری ماندن فرمولاسیون‌ها، حضور ماده فعال ویتامین D_2 در ساختار نانولیپوزوم‌هاست. همان طور که قبلاً گفته شد ویتامین D_2 به علت شبیه بودن به کلسترول و داشتن هیدروکسیل آزاد در ساختار خود می‌تواند مانند کلسترول با گروه کولین موجود در فسفاتیدیل کولین پیوند برقرار کند ولی پیوندهای هیدروژنی ایجاد شده توسط ویتامین نسبت به کلسترول ضعیفتر می‌باشد و ویتامین نمی‌تواند به تنهایی پایداری ایجاد شده توسط کلسترول را باعث شود. نتایج حاصل از پتانسیل زتا نیز نشان داد که ویتامین به مقدار جزئی باعث افزایش پتانسیل زتا شد که این ممکن است هم به دلیل کم ضعیف بودن پیوندهای ایجاد شده توسط ویتامین و هم به دلیل کم بودن غلظت ویتامین مورد استفاده نسبت به مقدار کلی لیپید در فرمولاسیون نانولیپوزوم‌ها باشد. به هر حال می‌توان گفت که در این تحقیق ویتامین D_2 در کنار کلسترول (هر چند به طور جزئی) باعث افزایش پایداری ساختار نانولیپوزوم‌ها شود ولی در فرمولاسیون نانولیپوزوم بدون کلسترول احتمالاً به دلیل دلایل گفته شده نتوانست پایداری مورد انتظار را به دست بیاورد.

بررسی پایداری ویتامین D_2 در نانولیپوزوم‌ها طی نگهداری

همان طور که گفته شد لیپوزوم‌ها از نظر ترمودینامیکی ناپایدار هستند و در طی زمان نگهداری، وزیکول‌ها تمایل دارند با هم ترکیب شده، لخته و توده تشکیل دهند و رسوب کنند و در نتیجه مواد درون پوشانی شده از وزیکول‌ها نشت کنند. میزان و سرعت نشت ماده فعال هسته‌ای به ماهیت ترکیب فعال (از نظر قطبیت و اندازه مولکولی)، ماهیت فسفولیپید (نوع اسید چرب و الکل در ساختار)، نسبت فسفولیپید به ماده فعال، روش تولید لیپوزوم و شرایط محیطی بستگی دارد. اگر ماده فعال تمایل زیادی به خروج از ساختار غشایی لیپوزومی داشته باشد، اصلاح غشاء ساختار

کدورت

خواص دارویی) مورد ارزیابی قرار گرفت. منحنی تنش برشی-سرعت برشی خط مستقیمی بود که از مبدا می گذشت و بنابراین رفتار نیوتنی سیستم را نشان داد (۲۹). گراسی و همکاران (۳۰)، ویژگی های رئولوژیکی سیستم های آبی آلژینات (پلی اورونیک) حاوی لیپوزوم ها را مورد بررسی قرار دادند. آنها بیان کردند که در غلظت ۲۰٪ پلی اورونیک، سیستم در دمای ۲۱ درجه سانتی گراد رفتار نیوتنی از خود نشان داد. در یک بررسی دیگر رفتار رئولوژیکی دیسپرسیون لیپوزومی در درون یک ژل ترموپلاستیک ساخته شده از اکسید اتیلن و اکسید پروپیلن مورد ارزیابی قرار گرفت. در دمای ۱۰°C سیستم حامل به حالت سل تبدیل شده و رفتار نیوتنی داشته و رابطه خطی بین تنش برشی-سرعت برشی وجود داشت.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که کلوسترول نقش مهمی در افزایش پتانسیل زتا و پایداری طولانی مدت لیپوزوم دارد بطوریکه به غیر از نمونه بدون کلوسترول، اندازه وزیکولهای سه تیمار حاوی کلوسترول، بعد از گذشت ۳۰ روز در دمای ۴°C در حد مقیاس نانو حفظ گردید. همچنین با گذشت زمان در هیچ کدام از فرمولاسیونها تغییر معنی داری در مقدار ویتامین D₂ درون پوشانی شده ایجاد نشد که به افزایش پتانسیل زتا و افزایش سفتی غشا توسط کلوسترول نسبت داده شد. با افزایش میزان کلوسترول، کدورت به طور معنی داری افزایش یافت که احتمالاً به دلیل ایجاد پیوندهای جدید بین گروه کولین لستین و گروه هیدروکسیل کلوسترول بوده است و همچنین محلول های لیپوزومی در تمامی غلظت های لستین-کلوسترول دارای رفتار نیوتنی بودند. در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که روش تولید مورد استفاده در این تحقیق از نظر ایجاد پایداری در اندازه ذرات و حفظ ماده درون پوشانی شده در طول زمان و دیگر خصوصیات مورد انتظار روش مناسبی بوده است.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به دلیل تأمین قسمتی از هزینه های مالی و برخی از امکانات دستگاهی و آزمایشگاهی و مرکز تحقیقات و توسعه شرکت تکدانه به دلیل پشتیبانی فنی در انجام آزمایشهای رئولوژیکی تشکر و قدردانی می شود.

کدورت توسط مقادیر نور پخش شده توسط ذرات موجود در محیط سوسپانسیون تعیین می شود و به تعداد و اندازه ذرات موجود در فاز مایع، تفاوت در ضریب انعکاس ذرات و محیط سوسپانسیون و توزیع اندازه ذرات بستگی دارد. با توجه به اینکه بین غلظتهای مختلف لستین-کلوسترول از لحاظ اندازه ذرات تفاوت معنی دار وجود ندارد افزایش میزان کدورت را می توان به ایجاد پیوندهای جدید بین گروه کولین لستین و گروه هیدروکسیل کلوسترول نسبت داد. با افزایش میزان کلوسترول پیوندهای ایجاد شده نیز بیشتر می شود که همین پیوندهای جدید باعث افزایش کدورت می شود. همچنین قرار گرفتن کلوسترول در ساختار دولایه-ای منجر به افزایش دانسیته ظاهری چیدمان مولکول های فسفولیپیدی می شود. این مولکول در هنگام تبدیل ساختارهای لاملار به وزیکول ها، در بین شکافهای ایجاد شده توسط زنجیره های آسیل قرار می گیرد (۲۷). افزایش دانسیته ظاهری ممکن است باعث افزایش میزان نور پخش شده توسط ذرات و افزایش کدورت شده باشد. همچنین افزایش کدورت ممکن است به ماهیت خود کلوسترول مربوط باشد یعنی احتمالاً کلوسترول بیشتر از لستین نور را منحرف می کند.

آزمون های رئولوژیکی پایا

آب که جزء غالب دیسپرسیون های نانولیپوزومی را تشکیل می دهد، دارای ویسکوزیته پایینی است و ویسکوزیته این نوع سیستم ها تحت تأثیر ویسکوزیته فاز پراکنده است. با افزایش سرعت برشی، ویسکوزیته ثابت می ماند که نشان می دهد سیستم حاوی ذراتی است که لخته نشده اند و اندازه ذرات بسیار کم می باشد. انواع سیستم های حامل کلوئیدی رفتار رئولوژیکی متفاوتی از خود نشان می دهند. معمولاً با افزایش نظم میکروساختار کریستال-های مایع، ویسکوزیته افزایش می یابد. ویسکوزیته دینامیک رفتار جریان برای کریستالهای مایع لاملار مانند لیپوزوم ها نسبتاً پایین است، ولی برای کریستال های مایع هگزاگونال و مکعبی نسبتاً بالا می باشد (۲۸). با توجه به نیوتنی بودن رفتار محلول های لیپوزومی در غلظت های مختلف انتخاب شده، می توان به این نتیجه رسید که محلول های فوق، محلول هایی رقیق بوده و هنوز به غلظت و کسر حجمی بحرانی نرسیده اند تا شاهد افزایش یکباره ویسکوزیته و ظهور رفتار سودوپلاستیک (روان شونده با برش) در آن باشیم. همچنین ویژگیهای رئولوژیکی نوشیدنی های مورد استفاده را تحت تأثیر قرار نخواهد داد. در پژوهشی، ویسکوزیته دیسپرسیون نانوحامل های لیپیدی حامل تاکرولیموس (متابولیت قارچی با

References

- Ovesen L, Andersen R, Jakobsen J. Geographical differences in vitamin D status, with particular reference to European countries. *P Nutr Soc* 2003; **62**: 813-821.
- Ovesen L, Brot C, Jakobsen J. Food contents and biological activity of 25- hydroxyvitamin D: a vitamin D metabolite to be reckoned with. *Ann Nutr Metabol* 2003; **47**: 107-113.

3. Considine T, Patel HA, Singh H, Creamer LK. Influence of binding conjugated linoleic acid and myristic acid on the heat- and high-pressure-induced unfolding and aggregation of [beta]-lactoglobulin B. *Food Chem* 2007; **102**: 1270-1280.
4. Bedie GK, Turgeon SL, Makhlof J. Formation of native whey protein isolate-low methoxyl pectin complexes as a matrix for hydro-soluble food ingredient entrapment in acidic foods. *Food Hydrocolloid* 2008; **22**: 836-844.
5. Weiss J, Takhistov P, McClement J. Functional materials in food nanotechnology. *J Food Sci* 2006; **71**: 107-116.
6. Fathi M, Mozafari MR, Mohebbi M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trend Food Sci Technol* 2011; **23**: 13-27.
7. Bowtle W. Lipid formulations for oral drug delivery. *Pharm Technol Eur* 2000; **12**: 20-30.
8. Mozafari MR. Micro and nano carrier technologies: high quality production within pharmaceutical standards. *Cell Mol Biol Lett* 2004; **9**: 44-45.
9. Keller BC. Liposomes in nutrition. *Trend Food Sci Technol* 2001; **12**: 25-31.
10. Marsanasco M, Márquez AL, Wagner JR, Alonso S, del V, Chiamaroni NS. Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Res Int* 2011; **44**: 3039-3046.
11. Ko S, Lee S-ch. Effect of nanoliposomes on the stabilization of incorporate retinol. *Afr J Biotechnology* 2010; **9**: 6158-6161.
12. Fatouros DG, Antimisariis SG. Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: A study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. *J Colloid Interface Sci* 2002; **251**: 271-277.
13. Chanda H, Das P, Chakraborty H, Ghosh A. Development and evaluation of liposomes of fluconazole. *J Biomed Pharma Sci* 2011; **5**: 2230-7885.
14. Xia S, Xu S. Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food Res Int* 2005; **38**: 289-296.
15. Ghanbarzadeh B. *Principles of Food and Food Biopolymer Rheology*. Tehran University Press, 2009; PP: 292-294.
16. Makino K, Yamada T, Kimura M, Oka T, Ohshima H, Kondo T. Temperature and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data. *Biophys Chem* 1991; **41**: 75-183.
17. Liu Z, Jiao Y, Wang Y, Zhou C, Zhang Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; **60**: 1650-1662.
18. Miller WL. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1771**: 663-676.
19. Mohammadhassani Z. Preparation and Evaluation of Nanoliposomes Containing γ -Oryzanol (a Nutraceutical Compound) Properties, MSc thesis, Aras International Campus, Department of Food Science and Technology, October 2012.
20. Padamwar MN, Pokharkar VB. Development of vitamin loaded topical liposomal formulation using factorial design approach: drug deposition and stability. *Int J Pharm* 2006; **320**: 37-44.
21. Mura P, Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Michelacci I, Ghelardini C, Rabasco AM. Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; **67**: 86-95.
22. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 2003; **24**: 4283-4300.
23. Freitas CM, Uller RH. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions. *Int J Pharm* 1998; **168**: 221-229.
24. Brandl M. Liposomes as drug carriers: A technological approach. *Biotechnology Annu Rev* 2001; **7**: 59-85.
25. Fatouros DG, Hatzidimitriou K, Antimisariis SG. Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone-cyclodextrin complexes: Comparison of membrane integrity and drug release. *Eur J Pharm Sci* 2001; **13**: 287-296.
26. Rasti B, Jinap S, Mozafari MR, Yazid AM. Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food Chem* 2012; **135**: 2761-2770.
27. Mohammed AR, Weston N, Coombes AGA, Fitzgerald M, Perrie Y. Liposome formulation of poorly water soluble drugs: Optimization of drug loading and ESEM analysis of stability. *Int J Pharm* 2004; **285**: 23-34.
28. Muller-Goymann CC. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; **58**: 343-356.
29. Pople PV, Sing KK. Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier: Application to topical delivery of tacrolimus. *Eur J Pharm Biopharm* 2011; **79**: 82-94.
30. Grassi G, Crevatin A, Farra R, Guarnieri G, Pascotto A, Rehimers B, et.al. Rheological properties of aqueous Pluronic-alginate systems containing liposomes. *J Colloid Interface Sci* 2006; **301**: 282-290.